

リンゴ未熟果によるネコカリシウイルスの感染抑制効果の検討

吉村 小百合^{1,2}・浅野 クリスナ^{2,3}・中根 明夫^{2,3}

Investigation of the inhibitory effect of feline calicivirus infection by immature apple fruits

Sayuri Yoshimura^{1,2}, Krisana Asano^{2,3}, Akio Nakane^{2,3}

Key words : リンゴ未熟果 Immature apple fruits
ネコカリシウイルス Feline calicivirus (FCV)

要 旨

我々は、青森県における天然資源を有効に活用することを目的として、サケ鼻軟骨からプロテオグリカン、ナマコに含まれる抗菌成分など有効な成分を抽出し、研究成果を報告してきた。資源の枯渇や周辺の環境への影響が心配される中で、天然資源を無駄なく利用することは重要であると言える。本研究では、リンゴの実選りで得られる未熟果の有効利用を検討した。ノロウイルスは感染性胃腸炎として食中毒を引き起こし、環境耐性および感染力が強く、治療薬がないことが課題となっている。ノロウイルスの研究代用で用いられるネコカリシウイルスに対して、リンゴ未熟果の感染抑制効果が期待できると考えられたので報告する。

1. はじめに

青森県では、天然資源が豊富に存在し、加工品として利用されている。しかし、加工時に廃棄される部分があり、利用価値を持った成分を含んだまま捨てられている。この廃棄される部分を有効に活用できれば、地域の産業発展に寄与すると考え、我々は青森県の素材に対する利用方法を検討してきた。これまで、我々はサケの頭部が廃棄されていることから、鼻軟骨からプロテオグリカン (PG) を精製し、その機能性を検討してきた。サケ鼻軟骨 PG が自己免疫疾患及びアレルギーに対する抗炎症作用を示し、炎症性サイトカインの抑

制を介した炎症抑制に対して効果があることを報告した¹⁾³⁾。PG の機能性は、乳酸を産生する *Lactobacillus* 属及び短鎖脂肪酸産生菌が有意に増加し、疾患に関係する細菌群が有意に減少することから、腸内細菌叢が改善することによる炎症の調節としての可能性が示唆された⁴⁾。また、ナマコ煮汁を用いて真菌に対する抗菌効果を報告した⁵⁾。また、あおもり藍のインフルエンザウイルスに対する不活化効果を明らかにした⁶⁾。青森県の天然資源は豊富に存在しているが、その中にはまだまだ機能性を有する可能性があると考えている。

-
1. 学校法人柴田学園 東北女子短期大学 生活科研究室
 2. 国立大学法人 弘前大学 医学研究科 感染生体防御学講座
 3. 国立大学法人 弘前大学 医学研究科 生体高分子健康科学講座

本研究では、青森で年間約 45 万 t の収穫量があり、最も多く生産されるふじの未熟果に着目した。リンゴの実は、5 月上旬に開花した子房を囲む花托の皮層が 2~5 cm 程度に膨み、実選りにより選別される。食品素材の中でリンゴ果汁には、一部のウイルスの感染力を阻止する報告もあるため、この未熟果の有効利用を検討した。

ノロウイルスはエンベロープをもたず、感染性胃腸炎として食中毒を引き起こすが、乾燥への耐性や酸性条件、エタノールが効きにくいという点で感染性を失わせることが難しい。ヒトの腸管上皮細胞でのみ増殖可能であり、感染を引き起こすウイルス数も 10~100 個程度である。ノロウイルスによる食中毒に対しては、制吐剤や整腸剤投与等の対処療法が一般的であり、抗ウイルス薬はない。人工培養できないことから、同科のネコカリシウイルス (FCV) が実験系として良く用いられる。FCV はヒトに感染性胃腸炎を起こすノロウイルスの研究代用ウイルスであり、エンベロープをもたず、環境での抵抗性が強い特徴がある。リンゴ未熟果によりこの FCV の感染を阻止することができれば、ノロウイルスに対する感染阻止においても同様の効果を発揮するものと考え、本研究では FCV に対する感染価を検討した。

2. 実験方法

1) 試料

①リンゴ果汁の調製

リンゴの実はミキサーを用いて破碎し、ガーゼにより搾汁した。4℃、12,000 rpm、5 分間の遠心分離により上清と沈渣に分別した。上清は、そのまま用い、沈渣は元の液量の 1x リン酸緩衝食塩水に懸濁させて使用した。遠心分離により沈渣を除去した上清は、0.22 µm フィルターでろ過除菌を行った。

2) FCV 感染に対する CRFK 細胞の CPE (細胞変性効果) による評価

① ウイルス感染

FCV F4 株を用い、細胞はネコ腎由来株化細胞

(Crandell-Rees Feline Kidney : CRFK) を用いた。ウイルスは 10 倍希釈系列を 10^{-10} 倍まで調製し用いた。ウイルスにろ過除菌した上清を 10 倍希釈で添加し、1 時間後、同様の希釈系列を調製した。96 well プレートに用意したコンフルエント状態の CRFK 細胞に希釈したウイルス 100 µL/well を加え、37℃、5% CO₂、1 時間感染させた。5% ウシ胎児血清添加 EMEM 培地に交換し、37℃、5% CO₂、2 日間培養した。CPE が認められた細胞を 0.5% Gentian violet 染色法により染色した。

② TCID₅₀法による評価

染色細胞に対し、CPE から Behrens-Karber 法を用いて TCID₅₀を算出した。

3. 結果

調製したリンゴ未熟果汁と FCV を反応させたところ、ウイルスの感染を抑制した (図 1)。次に、FCV の感染阻止成分が上清および沈渣に含まれているかを検討するため、遠心分離により得られた上清及び沈渣に対して FCV と反応させたところ、図 2 に示すように FCV の感染を阻止する成分が上清に含まれていることが示された。リンゴの未熟果による有効性を検討するために、成熟果実及び未熟果実の搾汁に対して、同様に FCV に反応させたところ、成熟果実では感染抑制効果が減退することを確認した (図 3)。

FCV のみ及び上清をろ過除菌したリンゴ未熟果汁と接触させた FCV に対して TCID₅₀法により比較を行った (図 4)。リンゴ未熟果汁上清を添加した FCV の TCID₅₀ 価は未添加の $8.11 \pm 0.19 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ から $6.00 \pm 0.33 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ に減少することが確認され、約 1/100 に減少することが示された (図 4B)。

リンゴの未熟果には、FCV に対する感染を阻止する成分が含まれることが示された。成熟果では効果が弱まることから、未熟果の方がより効果的であることが確認された。また、上清に効果がみられるため、水溶性の物質であり、果汁に含まれる成分が効果を示すことが確認された。

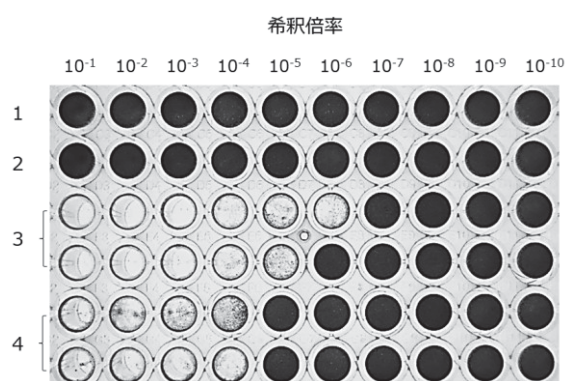


図1 FCV に対するリンゴ未熟果果汁の感染抑制効果

- 1: 非感染
- 2: 未熟果汁添加および未感染
- 3: FCV 感染のみ
- 4: 未熟果汁添加した FCV の感染

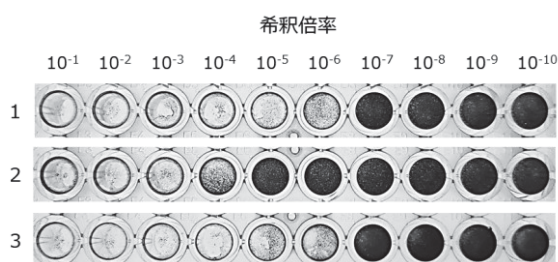


図2 FCV に対するリンゴ未熟果果汁上清および沈渣別の感染抑制効果

- 1: FCV 感染のみ
- 2: リンゴ未熟果果汁後上清添加した FCV の感染
- 3: リンゴ未熟果果汁沈渣添加した FCV の感染

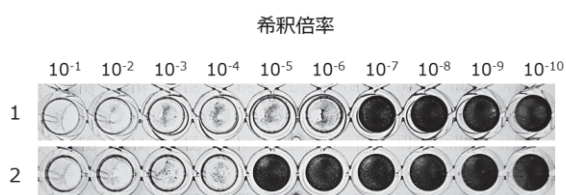
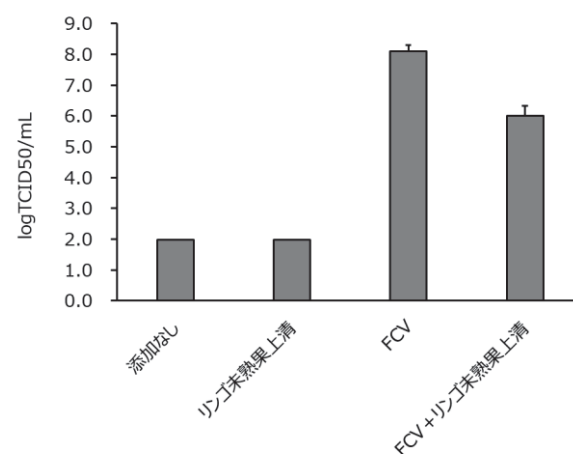


図3 FCV に対する成熟果および未熟果の感染抑制効果の比較

- 1: リンゴ成熟果果汁添加した FCV 感染
- 2: リンゴ未熟果果汁添加した FCV の感染

A



B

	logTCID ₅₀ /mL	TCID ₅₀ /mL
添加なし	<1.98*	<95*
リンゴ未熟果上清	<1.98*	<95*
FCV	8.11±0.19	1.4X10 ⁸
FCV+リンゴ未熟果上清	6.00±0.33	1.2X10 ⁶

*検出不可

図4 TCID₅₀法による比較

A: リンゴ未熟果上清添加および非添加に対する

logTCID₅₀/mL の差

B: リンゴ未熟果上清添加および非添加における

logTCID₅₀/mL 値および TCID₅₀/mL 値

4. 考察

FCV は飛沫感染による伝搬及び増幅を利用する呼吸器ウイルスであり、ネコに現れる疾患は結膜炎及び呼吸器感染である点がノロウイルスと相違する⁷⁾。従って、ネコカリシウイルスやマウスノロウイルスに効果的であっても、ノロウイルスに対して有効であるとは限らない。ノロウイルスは胃酸程度の pH では不活性化されない。また、アルコール製剤による不活性化効果も低く、アルコール製剤による手指衛生はアウトブレイク終息に無効と言われている。今回の結果では、リンゴ未熟果には FCV の感染抑制効果が期待できると考えられたが、未熟果の pH が酸性条件であることを考慮すると、pH による感染力の低減という点が否定できないと考えられた。報告によると、FCV は pH2.0 以下において検出限界となること

が確認されている^{8,9)}。このため、リンゴ未熟果搾汁は、pH3~4 程度であるため、低 pH により TCID₅₀ 価が減少する可能性も考えられた。しかし、ノロウイルスは腸管上皮細胞でのみ増殖可能であり、胃酸などの酸性条件においても耐えうる¹⁰⁾。今回の結果から、酸性条件で機能性を発揮することは、腸管におけるノロウイルスに対する増殖抑制に対する効果が期待できる。また、ノロウイルスでは抗菌薬が効かないため、食中毒症状の下痢による脱水症状を防ぐことが重要となる。ノロウイルスに感染した際、経口補水液とともに摂取することにより症状の軽減が期待できる可能性も考えられる。また、TCID₅₀ 価は、リンゴ未熟果果汁そのままによる効果が較的に低いいため、成分の精製方法を確立し、検討することも必要であると考えている。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導とご支援頂きました弘前大学大学院 医学研究科 感染生体防御学講座の皆様に感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) Mitsui T, Sashinami H, Sato F, et al.: Salmon cartilage proteoglycan suppresses mouse experimental colitis through induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 402, 209-215 (2010)
- 2) Sashinami H, Asano K, Yoshimura S, et al.: Salmon proteoglycan suppresses progression of mouse experimental autoimmune encephalomyelitis via regulation of Th17 and Foxp3+ regulatory T cells. *Life Sci*, 91, 1263-1269 (2012)
- 3) Yoshimura S, Asano K, Nakane A.: Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by salmon proteoglycan. *Biomed Res Int*, 2014, 406-453 (2014)
- 4) Asano K, Yoshimura S, Nakane A.: Alteration of intestinal microbiota in mice orally administered with salmon cartilage proteoglycan, a prophylactic agent. *PLoS One*, 8, e75008 (2013)
- 5) 吉村 小百合, 浅野 クリスナ, 中根 明夫, 細菌及び真菌に対する青森県食品素材による抗菌性の検討, 東北女子短期大学 紀要, 57, p45-50 (2018)
- 6) 中根明夫, 浅野クリスナ, 桜庭裕丈, 菊池英純, 佐々木健郎, 吉田久幸, インフルエンザ阻害剤, 特願 2019-216910 (2019)
- 7) 牛島 廣治, 沖津 祥子, Khamrin P, 2. カリシウイルス, ウイルス 第 61 巻, 第 2 号, p193-204 (2011)
- 8) Cannon JL., Papafragkou E, Park GW, et al.: Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Protect* 11, 2761-2765 (2006)
- 9) Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, et al.: Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol*, 70, 4538-4543 (2004)
- 10) Tung-Thompson G, Gentry-Shields J, Fraser A, et al.: Persistence of human norovirus RT-qPCR signals in simulated gastric fluid. *Food Environ Virol*, 7, 32-40 (2015)